CAPÍTULO 2.3.3.

ENFERMEDAD DE LA CABEZA AMARILLA

1. DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD

A efectos de este capítulo, se considera que la enfermedad de la cabeza amarilla (ECA) es una infección causada por el virus de la enfermedad de la cabeza amarilla (YHV).

2. INFORMACIÓN PARA EL DISEÑO DE PROGRAMAS DE VIGILANCIA

a) Factores del agente

- Agente etiológico y cepas del mismo: el virus de la enfermedad de la cabeza amarilla (genotipo 1) es uno de los seis genotipos conocidos de virus del complejo de la cabeza amarilla y es el único agente conocido de la enfermedad de la cabeza amarilla. Se designa como genotipo 2 al virus asociado de la branquia (GAV). El GAV y otros cuatro genotipos conocidos del complejo (los genotipos 3, 4, 5, 6) se presentan generalmente en *Penaeus monodon* sanos del este de África, de Asia y de Australia, y o bien no se asocia con la enfermedad o lo hace en raras ocasiones (29, 32). El YHV y otros genotipos del complejo de la cabeza amarilla son clasificados por la Comisión Internacional para la Taxonomía de los Virus como especies únicas del género *Okavirus*, de la familia *Roniviridae*, del orden de los *Nidovirales* (28). Existe evidencia de la existencia de recombinación genética entre los genotipos (32).
- Supervivencia fuera del hospedador: el YHV permanece viable por un periodo de hasta 72 horas en aguas marinas oxigenadas (8).
- Estabilidad del agente: el YHV puede inactivarse por calor a 60°C durante 15 minutos (8). Actualmente existe poca información sobre otros métodos de inactivación pero parece que el virus es susceptible al tratamiento con cloro a 30 ppm (6).
- Ciclo biológico: no se han descrito infecciones por YHV con multiplicidad alta en cultivos celulares. La infección con una multiplicidad infectiva de 0,001 en cultivo celular del órgano linfoide primario indicó que se obtiene un título vírico máximo 4 días después de la infección. Los signos clínicos de la ECA se presentan en *P. monodon* a los 7–10 días de la exposición.

b) Factores del hospedador

- Especies hospedadores susceptibles: se ha descrito que las infecciones naturales y/o experimentales se presentan en las siguientes especies de gambas peneidas y palemónidas y de langostinos y krill: langostino jumbo (*Penaeus monodon*), langostino tigre marrón (*Penaeus esculentus*), langostino japonés (*Marsupenaeus japonicus*), langostino banana (*Fenneropenaeus merguiensis*), langostino patiblanco (*Litopenaeus vannamei*), langostino azul (*Litopenaues stylirostris*), langostino blanco norteño (*Litopenaeus setiferus*), langostino café (*Farfantepenaeus aztecus*), langostino rosado (*Farfantepenaues duorarum*), langostino resbaloso (*Metapenaeus ensis*), langostino rabo verde (*Metapenaeus bennettae*), camarón (*Machrobrachium sintangene*), camarón rosna (*Palaemon styliferus*), camarón carpintero (*Palaemon serrifer*), camarón de pasta (*Ascetes* sp.), krill (*Euphasia superba*). La susceptibilidad a la enfermedad varía según la especie. En las pruebas de laboratorio se ha demostrado que el YHV puede causar gran mortalidad en *P. monodon, L. vannamei, L. stylirostrus, F. aztecus, F. duorarum, M. sintangene*, *P. styliferus* y *P. serrifer* (12, 15–17).
- Fases susceptibles del hospedador: las *P. monodon* son susceptibles a la infección por YHV en fases posteriores a la de L15 (10). Las infecciones experimentales con GAV indican que los

langostinos *M. japonicus* más grandes (~20 g) son menos susceptibles a la enfermedad que las más pequeñas (~6–13 g) de la misma especie (23).

- Predilección de subpoblación o especies (probabilidad de detección): entre las especies de gambas susceptibles, sólo se sabe que los virus del complejo de la cabeza amarilla (genotipos 2–6) aparecen (prevalencia hasta un 100%) en *P. monodon* sanas, que parecen ser el hospedador natural (29, 32). Sin embargo, las infecciones por YHV (genotipo 1) se detectan generalmente sólo en caso de enfermedad y habitualmente no se presentan en las *P. monodon* sanas. Se han detectado infecciones naturales por YHV en *M. japonicus, F. merguiensis, L. setiferus, M. ensis, P. styliferus* y *E. superba* (7, 8).
- Órganos diana y tejidos infectados: el YHV afecta a tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico, incluido el órgano linfoide, los hematíes, el tejido hematopoyético, las laminillas de las branquias y el tejido conjuntivo esponjoso del subcutis, el intestino, la glándula antenal, las glándulas sexuales, los tractos nerviosos y los ganglios (3, 11).
- Infección persistente con portadores asintomáticos: GAV persiste como una infección crónica en las *P. esculentus* supervivientes al menos durante 50 días después del desafío experimental (24). La elevada prevalencia de la infección por GAV y otros virus del complejo de la cabeza amarilla (genotipos 2-6) en todas las fases de vida de las *P. monodon* sanas nos sugiere que las infecciones crónicas asintomáticas son habituales (29, 32). También existe evidencia de la persistencia del YHV (genotipo 1) en supervivientes de la infección experimental. (T.W. Flegel, pers. comm.).
- Vectores: no existen vectores conocidos del YHV.

c) Patrón de la enfermedad

- Mecanismos de transmisión: el YHV puede transmitirse horizontalmente por inyección. Por ingestión de tejidos infectados, por inmersión en extractos de tejido filtrados por membrana o por cohabitación con gambas infectadas (8, 11). También se ha demostrado la transmisión por inyección de extractos de camarón de pasta (*Acetes* sp.) recogidos de estanques infectados (7). Se ha demostrado que la ECA se transmite verticalmente desde los progenitores hembra y macho, probablemente por contaminación de la superficie o por infección del tejido que rodea al huevo fertilizado (5).
- Prevalencia: en general es muy alta (50–100%) la prevalencia de los virus del complejo de la cabeza amarilla en *P. monodon* sanos (tal como se detecta por medio de la reacción en cadena de la polimerasa anidada [PCR]) en la mayoría de las poblaciones de piscifactoría y silvestres muestreadas en Australia, Asia y el Este de África. La prevalencia de genotipos individuales varía de acuerdo con el origen geográfico de las gambas. La prevalencia del YHV (genotipo 1) puede ser baja (>1%) en *P. monodon* silvestres o de piscifactoría, pero podría ser muy alta (cercana al 100%) en los estanques con brotes de la enfermedad. Mediante otros métodos de detección menos sensibles (ej. la histología, la inmunotransferencia, el dot-blot, la hibridación *in-situ*), la prevalencia de la infección en las gambas sanas sería más baja.
- Distribución geográfica: se ha descrito la ECA en la República Popular China, India, Indonesia, Malasia, Filipinas, Sri Lanka, Taiwán, Tailandia, y Vietnam (1, 11, 18, 29, 30, 31). Se han detectado el GAV y otros genotipos del complejo de la cabeza amarilla en *P. monodon* sanas procedentes de Australia, India, Indonesia, Malasia, Mozambique, Filipinas, Taiwán, Tailandia y Vietnam (29, 32).
- Mortalidad y morbilidad: la ECA puede causar una mortalidad de hasta un 100% en estanques de *P. monodon* infectados dentro de los 3 días siguientes a la aparición de los primeros signos clínicos. En Australia se ha asociado a los GAV con una mortalidad de hasta un 80% en los estanques de *P. monodon*.
- Repercusión económica y productiva de la enfermedad: en 1996 se estimó que el impacto económico del YHV en Tailandia había sido de 30 millones de dólares en 1992 y de 40 millones en 1993. Aunque esto representa sólo un 3-4% del valor bruto de la producción, la

pérdida total de la cosecha durante el cultivo tiene un impacto muy significativo en los productores particulares.

d) Control y prevención

- Vacunación: no se han desarrollado métodos efectivos de vacunación de forma consistente.
- Quimioterapia: no existen informes confirmados científicamente.
- Inmunoestimulación: no existen informes confirmados científicamente.
- Producción de resistentes: no se ha descrito.
- Repoblación con especies resistentes: no se ha descrito.
- Agentes bloqueadores: no se han descrito.
- Prácticas generales de manejo: para reducir el riesgo de la enfermedad, se pueden utilizar *stocks* de inóculo libres de patógeno específico (LPE) o negativos por la PCR, agua biosegura y sistemas de cultivo.

3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

a) Métodos de diagnóstico de campo

- Signos clínicos: el YHV puede infectar las gambas de cultivo desde las formas postlarvarias en adelante, pero la mortalidad masiva generalmente aparece en las formas juveniles tempranas y tardías. Excepcionalmente, puede darse una gran actividad alimenticia seguida de un cese repentino de alimentación a los 2-4 días de la aparición de signos clínicos graves de la enfermedad y de mortalidad. (3, 13). Las gambas moribundas pueden congregarse en los bordes de los estanques, cerca de la superficie. Las gambas moribundas pueden mostrar una apariencia blanquecina en su conjunto y una decoloración amarillenta del cefalotórax causada por el hepatopáncreas amarillo subyacente que puede aparecer excepcionalmente blando cuando se compara con el hepatopáncreas marrón de una gamba normal. En muchos casos, se produce una pérdida total de la cosecha a los pocos días de la primera aparición de gambas con signos graves de ECA. Mientras que los brotes de ECA siempre van acompañados del cese de la alimentación, congregación en los bordes de los estanques y aspecto generalmente blanquecino, estas características de la enfermedad no son específicas de la ECA. Los otros signos, más patognomónicos, no se ven siempre y por tanto no son fiables, incluso para diagnósticos presuntivos de la ECA.

  Los signos graves de la enfermedad del GAV incluyen la natación cerca de la superficie y en los bordes de los estanques, el cese de la alimentación, el enrojecimiento del cuerpo y del apéndice y la coloración de las branquias entre rosa y amarillo. Sin embargo, estos signos, que ocurren generalmente en las gambas enfermas, no se consideran patognomónicos para la enfermedad del GAV.

b) Métodos clínicos

- Lesiones macroscópicas: véase sección 3.a más arriba.
- Química clínica: no se ha descrito ninguna.
- Examen microscópico

  Las gambas moribundas recogidas de los bordes de los estanques durante un brote de la enfermedad constituyen el material preferido para realizar el examen.

  Aparentemente las gambas normales también podrían recogerse del mismo estanque.

  - Preparaciones montadas: se fija la gamba entera o filamentos de branquia con fijador de Davidson durante toda la noche (11). Después de la fijación, se lavan bien varios

filamentos de branquia con agua corriente para separar el fijador y se tiñen con hematoxilina y eosina de Meyer (H&E) (11). Después de la tinción y deshidratación, cuando el tejido está en xileno, se coloca un filamento de branquia en el porta de un microscopio en una gota de xileno y, utilizando un par de agujas finas (es útil un microscopio estéreo), se rompen varios filamentos secundarios. Se reemplaza el filamento principal en xileno donde pueda almacenarse de forma indefinida en un vial sellado como referencia permanente. Sin dejar que se seque el xileno, se deshilachan los filamentos secundarios sobre el porta del microscopio y se desechan los fragmentos grandes a partículas que puedan espesar la preparación de forma innecesaria. Finalmente, se añade una gota de líquido de montaje y un cubreobjetos. Se usa la presión de la luz para allanar la preparación lo máximo posible. También se puede utilizar este procedimiento con capas finas de tejido subcuticular. Se examina con un microscopio de campo claro con una lente de ×40. Para muestras de brotes de ECA, se observarán inclusiones citoplasmáticas, esféricas, teñidas de forma uniforme, profundamente basófilas en cantidades moderadas o grandes (aproximadamente 2 µm de diámetro o menores) (6). Esta evidencia debe utilizarse de forma conjunta con los resultados de frotis de hemolinfa (véase más adelante) a la hora de hacer el diagnóstico presuntivo de un brote de ECA. Por lo que respecta a los tejidos fijados y los filamentos en xileno, estos portas con preparaciones completas pueden conservarse como registros permanentes.

Si se requieren resultados rápidos, se puede acortar la fase de fijación a dos horas cambiando la porción de ácido acético en la fórmula de preparación de fijador de Davidson a concentrado de HC1 al 50%. Para obtener los mejores resultados, esta fijación no debe almacenarse por más de dos días antes de ser utilizada. Después de la fijación, se lava cuidadosamente para retirar el fijador y se comprueba que el pH vuelva a ser casi neutro antes de la tinción. No se debe fijar por períodos largos o por encima de los 25º ya que esto podría dañar en exceso los tejidos, con lo que se hará difícil o imposible la interpretación.

- Frotis: con gambas moribundas por brotes de ECA, los frotis de hemolinfa no son útiles porque, normalmente, los hemocitos están mermados en las fases avanzadas de la enfermedad. Las muestras de hemolinfa deben obtenerse de gambas claramente sanas procedentes de un estanque sospechoso del que también han recogido las gambas moribundas. Se descarga la hemolinfa dentro de una jeringa que contenga dos volúmenes bien sea de formalina al 25% o de fijación de Davidson en la que el ácido acético de la fórmula ha sido reemplazado por agua o formalina. Se mezcla cuidadosamente, sin preocuparse por los coágulos de la jeringa, se coloca una gota sobre un porta de microscopio, se frota y luego se deja que se seque al aire antes de teñir con H&E o con otro método de tinción estándar de frotis de sangre. Se deshidrata, se añade una gota de líquido de montaje y un cubre. Se examina al microscopio de campo claro con lentes de objetivo de ×40. Con muestras obtenidas tras un brote de la ECA, algunos de los frotis mostrarán cantidades de hemocitos entre moderadas y grandes, con núcleos cariorrécticos o picnóticos (19). Es importante que en los portas en que aparecen estos núcleos no se detecte la presencia de bacterias contaminantes, dado que las infecciones bacterianas pueden producir cambios similares en los hemocitos. Cuando se realiza un diagnóstico presuntivo de un brote de ECA, pueden usarse los resultados obtenidos por frotis de hemolinfa en conjunción con los obtenidos por tinción rápida de preparaciones montadas completas (véase más arriba) o de cortes de tejido teñidos.
- Cortes fijados: se fijan seis gambas moribundas procedentes de un brote sospechoso de ECA con fijador de Davidson y se procesan para preparación de cortes de tejido estándar teñidos con H&E (2, 11). Se examinan los cortes con un microscopio de campo claro para buscar cantidades grandes o moderadas de basófilos, teñidos de forma uniforme, inclusiones citoplasmáticas de aproximadamente 2 µm de diámetro, o más pequeñas, en tejidos de origen mesodérmico o ectodérmico (3). Son muy útiles los tejidos de órganos linfoides, del subcutículo estomacal y de las branquias.

Los esferoides de los órganos linfoides se observan normalmente en las *P. monodon* sanas infectadas crónicamente con GAV y, a menudo, se observa necrosis de los órganos linfoides (22, 25). Sin embargo, la formación de esferoides y la degeneración del tejido de los órganos linfoides también se produce durante la infección con otros virus de las gambas (11, 21).

- Microscopía electrónica: no se aplica.

c) Detección del agente y métodos de identificación

- **Métodos de detección directa**

i) Métodos microscópicos

- *Microscopía electrónica de transmisión* (*MET*): los tejidos de gambas moribundas, sospechosas de infección por YHV que resultan más apropiados para su uso con la MET, son los de órganos linfoides y branquias. Para el análisis o la vigilancia de las gambas de apariencia normal, el tejido más apropiado es el de órganos linfoides.

  Se aturden las gambas vivas mediante inmersión en agua helada hasta que queden inmovilizadas o mueran por inyección de fijador. Rápidamente se diseccionan y se retiran pequeñas porciones de tejido diana (de un diámetro de unos pocos centímetros) y se fijan en al menos 10 volúmenes de glutaraldehído al 6% y a 4°C y tamponado con solución de cacodilato sódico ($Na[CH_3]_2AsO_2{\cdot}3H_2O$) (8,6 g de cacodilato de Na, 10 g de NaCl, agua destilada hasta un volumen de 100 ml, ajustado a pH 7 con 0,2 N HCl) o solución de fosfato (0,6 g de $NaH_2PO_4{\cdot}H_2O$, 1,5 g de Na_2HPO_4, 1 g de NaCl, 0,5 g de sacarosa, 100 ml de agua destilada, ajustado a pH 7 con 0,2 N HCl). Se fija durante al menos 24 horas antes de su procesamiento. Para almacenarlo durante largo tiempo en fijador a 4°C, se reduce el glutaraldehído al 0,5–1,0 %. El procesamiento implica la post-fijación con tetraóxido de osmio al 1%, deshidratación, inclusión, seccionado y tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo según los métodos MET. Se han descrito en otros sitios los reactivos utilizados en estos procedimientos (11).

  En las células infectadas por YHV, se observan los precursores de la nucleocápsida y los viriones de envoltura completos. Los precursores de la nucleocápsida son filamentos largos, de aproximadamente 15 nm de diámetro y longitud variable (80–450 nm) que aparecen en el citoplasma, a veces densamente apiñados en series paracristalinas. Los viriones son partículas en forma de bastón y con una envoltura (40–60 nm × 150–200 nm) con extremos redondeados y protuberancias destacadas (8–11 nm) que se extienden desde la superficie. Los viriones suelen encontrarse en el citoplasma de las células infectadas asociadas a las vesículas intracelulares. También pueden observarse viriones que germinan en la membrana citoplasmática y en los espacios intersticiales. Los viriones y las nucleocápsidas del GAV no se distinguen de los del YHV cuando se observan mediante MET.

ii) Aislamiento e identificación del agente

- *Cultivo celular/medios artificiales:* aunque existen métodos primarios de cultivo celular de gambas, no se recomiendan para el aislamiento/identificación del YHV debido al elevado riesgo de contaminación por agentes inesperados.
- *Bioensayo:* el procedimiento del bioensayo se basa en el descrito por Spann *et al.* (22), pero se han descrito procedimientos similares por otros autores (16, 20, 30). Se debe emplear el bioensayo con gambas susceptibles (véase la sección 2.b, más arriba) para las que se haya certificado la ausencia de un agente patógeno específico y que se hayan recogido en una instalación de cría biosegura. De forma alternativa, las gambas silvestres o cultivadas susceptibles que se hayan de utilizar en el bioensayo deben analizarse mediante PCR anidada de transcripción inversa (RT) con muestras de hemolinfa a fin de confirmar la ausencia de infecciones pre-existentes crónicas por

YHV, GAV o virus relacionados. Las gambas deben mantenerse en condiciones óptimas a lo largo del proceso para garantizar la supervivencia de la especie en cultivos de laboratorio.

Se recogen gambas moribundas tras el brote de la enfermedad o gambas sospechosas de ser portadoras de la enfermedad y se mantienen a 4°C o en hielo. Se separan y desechan la cola y los apéndices. Si es preciso, se congela la gamba entera o el cefalotórax y se guarda a –80°C o en nitrógeno líquido hasta que se necesiten. Se descongelan rápidamente las muestras guardadas con un baño de agua a 37°C dentro de de dos bolsas de plástico selladas y luego se mantienen a 4°C o en hielo durante todo el proceso. Se desechan el caparazón y las partes calcíferas de la boca. Se suspenden los tejidos restantes en seis volúmenes de tampón TN (0,02 M de Tris/HCl, pH 7,4, 0,4 M de NaCl) y se homogeneiza con un triturador de tejidos hasta formar una suspensión fina. Se clarifica el homogeneizado a 1.300 ***g*** durante 20minutos a 4°C. Se separa el líquido sobrenadante que hay debajo de la capa de grasa y se pasa por un filtro de 0,45 µm. Se mantiene el filtrado a 4°C para su uso inmediato o se congela y almacena en alícuotas a –80°C o en nitrógeno líquido. Se descongela rápidamente el filtrado a 37°C y se mantiene en hielo antes de usar.

Se inyectan al menos doce ejemplares juveniles de gamba (1–5 g) de una especie susceptible conocida (*P. monodon*, *P. esculentus*, *M. japonicus*, *F. merguiensis*, *L. vannamei*, *L. stylirostris*), con 5 µl de filtrado por gramo de peso corporal en el segundo segmento abdominal utilizando una aguja del calibre 26. Se inyectan dos grupos equivalentes de al menos 12 gambas con tampón TN y un extracto de tejido filtrado y preparado a partir de gambas sanas. Finalmente, debe inyectarse un grupo adicional de al menos 12 gambas con un inóculo de control positivo conocido y calibrado procedente de gambas infectadas con YHV o GAV (según sea el caso). Se mantiene cada grupo de gambas en tanques cubiertos separados y con suministro independiente de agua mientras dure el bioensayo. Siguiendo la buena práctica de laboratorio, debe impedirse la transferencia accidental de agua entre los tanques. Se observan las gambas y se registran las mortalidades durante al menos 21 días o hasta que los grupos control de prueba y positivo alcancen el 100 % de mortalidad. Se recoge al menos una gamba moribunda de cada uno de los cuatro grupos para su examen por histología, MET, hibridación *in-situ* de ácido nucleico, y PCR o el análisis por inmunoelectrotransferencia para confirmar la presencia de YHV o GAV (según sea el caso) en la muestra (más adelante aparecen los cortes con los procedimientos de prueba correspondientes).

Adviértase que las gambas de prueba que son sospechosas de ser portadoras de infecciones crónicas de bajo nivel pueden producir un inóculo con una dosis muy pequeña de virus. En el bioensayo, dicho inóculo puede que no cause mortalidad, síntomas generales de la enfermedad o signos histológicos de una infección letal. Si ese es el caso, deben aplicarse a las gambas del bioensayo pruebas moleculares o análisis por MET.

- *Métodos de detección de antígeno basados en el uso de anticuerrpos:*

  Detección por inmunotransferrencia:

  Se preparan los reactivos y se realizan los ensayos de acuerdo con los protocolos de Lu *et al.* (16) y Loh *et al.* (14). Ello incluye la purificación de los viriones de YHV de gambas infectadas en el laboratorio, la generación de inmunoglobulinas (Igs) en conejos blancos de Nueva Zelanda, la purificación de la IgG mediante columnas de proteína-G bacteriana recombinante y la separación de los antígenos de gamba normal de reacción cruzada por adsorción en tejido de músculo y hemolinfa de gamba secada en acetona y molida. Para el ensayo, se separa 0,1 ml de hemolinfa de ejemplares de gamba viva y se diluye en un volumen igual de tampón de citrato para uso inmediato o se almacena a –80°C hasta su uso. Para la inmunoelectrotransferencia, se usa una muestra de 200 µl, se

clarifica a 8.000 ***g*** durante 5 minutos y luego se precipita el sobrenadante 140.000 ***g*** durante 5 minutos. Se resuspende el precipitado en 100 µl 2 × tampón de carga (2,5 ml 0,5 mM de Tris/HCl, pH 6,8, 4 ml de dodecil sulfato de sodio al 10% [SDS], 2 ml de glicerol, 1 µl de beta-mercaptoetanol, y 0,5 ml de agua destilada desionizada) y se calienta a 95°C durante 5 minutos. Se coloca una submuestra de 10 µl en SDS al 5% /gel de poliacrilamida, y se realiza electroforesis a 200 V. Se seca el gel sobre una membrana de nitrocelulosa (con poros de 0,1 mm) en tampón para electroforesis (3,03 g de Tris base, 14,4 g de glicina, y 200 ml de metanol por litro) a 100 V durante 1 hora. Se lava la membrana con solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, se empapa con 5% de leche desnatada (en PBS) durante 1 hora, y aclarar con PBS durante 5 minutos. A continuación, se trata la membrana con una dilución 1/1.000 del anticuerpo primario (IgG) durante 1hora, se lava tres veces con PBS durante 5 minutos, y luego se trata con una dilución 1/2500 de conjugado de peroxidasa de rábano e IgG de cabra anti-ratón durante 1 hora. Se lava de nuevo tres veces con PBS durante 5 minutos y luego se trata con substrato, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, hasta que se torne de color azulado/morado. Se detiene la reacción empapando la membrana con agua destilada. Todas las incubaciones deben realizarse a 25°C ± 2°C. Se usa una preparación vírica purificada como control positivo y se identifican 2–4 bandas de proteína importantes características del YHV a 116, 64 y 20 kDa. La sensibilidad es 0,4 ng de proteína de YHV (≈ 10^6 viriones de YHV).

- *Técnicas moleculares:*

  Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (*RT-PCR*):

  Se describen tres métodos de RT-PCR. El primer protocolo es la RT-PCR simple adaptada de Wongteerasupaya *et al.* (33), que puede utilizarse para la confirmación de YHV en gambas recogidas en zonas en las que se sospecha que hay un brote de YHV, no de GAV ni de otros genotipos. El segundo protocolo es una PCR anidada de transcripción inversa múltiple, más sensible, que se ha adaptado de Cowley *et al.* (4). Puede utilizarse para la detección diferenciada de YHV y de GAV en gambas afectadas por brotes de la enfermedad o para el análisis de portadores sanos. Con esta prueba no se detectarán todos los genotipos conocidos del complejo "cabeza amarilla", y el genotipo 3 puede reaccionar como GAV. Una forma de la prueba convenientemente modificada disponible en una fuente comercial (Farming IntelliGene Technology Corporation, Taiwán). La OIE exige un proceso formal de validación y pruebas comerciales para la certificación. En la página Web de la OIE se ofrece una lista de kits y productos de prueba certificados. El tercer protocolo consiste en una PCR de transcripción inversa anidada proporcionada por Wijegoonawardane, Cowley & Walker (no publicada). Esta prueba se puede utilizar para el detectar virus de la familia cabeza amarilla en gambas sanas. Con ella se pueden detectar los seis genotipos conocidos en la actualidad (incluidos el YHV y el GAV) pero no sirve para establecer diferencias entre genotipos. La especificación del genotipo se puede lograr mediante análisis del producto PCR-RT en secuencias de nucleótidos.

  Preparación de la muestra:

  Con gambas juveniles o adultas, para la preparación de ARN total, se puede usar el órgano linfoide, tejido de branquia o hemolinfa, siendo preferible un tejido fresco. También son adecuados para la preparación de ARN total el órgano linfoide y el tejido de branquia conservados en etanol de grado analítico al 95% o ARN*later* (hay varios fabricantes), o congelados y guardados a –70°C. Se alteran 10–20 mg de órgano linfoide o tejido de branquia o 50 µl de hemolinfa en 500 µl de reactivo Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) y se extrae ARN total siguiendo el manual de instrucciones del producto. Se resuspende ARN en 25 µl de agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato), se calienta a 55°C durante 10 minutos, se enfría en hielo y se usa de inmediato o se guarda a –70°C hasta que se requiera de nuevo. Lo ideal es preparar una dilución 1/200 (i.e. 2,5 µl de ARN en 500 µl de agua tratada con DEPC), y

determinar las absorbancias A_{260} nm y A_{280} nm (se requiere un espectrómetro UV) para cuantificar y comprobar la calidad del ARN. El producto ARN varía según el tipo de tejido y lo fresco que esté, y según la calidad del conservante utilizado y el período de conservación. No obstante, el producto aproximado de ARN procedente de tejidos frescos varía entre 0,2 y 2,0 µg/µl y los tejidos conservados en alcohol varían aproximadamente entre 0,1 y 1 µg/µl.

En un tanque de cría que contenga 100.000 ó más postlarvas (PL), se muestrean en torno a 1.000 PL en cinco puntos diferentes. Se mezclan las muestras en un recipiente, se agita suavemente el agua del recipiente y a continuación se selecciona una muestra de ensayo de entre las PL vivas del centro del recipiente. Se escoge el número de la muestra según la prevalencia asumida o diana. Se homogeneiza la muestra en un volumen adecuado de reactivo Trizol™ y se extrae el ARN de acuerdo con el manual de instrucciones del producto.

Con cada juego de muestras de ARN de ensayo, deben incluirse agua tratada con DEPC y extractos que contengan ARN de YHV y/o ARN de GAV (según cuál sea pertinente para la prueba) como controles positivo y negativo, respectivamente.

Protocolo 1: RT-PCR para la detección específica del YHV en gambas infectadas

Se mezclan 2 µl de RNA en 20 µl de tampón PCR (10 mM de Tris/HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl) que contenga 2,5 U de M-MLV (virus de la leucemia murina de Moloney) transcriptasa inversa, 1,0 U de inhibidor de ribonucleasa, 0,75 µM de cebador inverso o antisentido (144R, que aparece más adelante), 1 mM de cada uno de los cebadores dATP, dTTP, dCTP, y dGTP, y 5 mM de $MgCl_2$, y se incuba a 42°C durante 15 minutos para sintetizar el cADN. A continuación, se incuba la mezcla a 100°C durante 5 minutos para inactivar la transcriptasa inversa y se deja enfriar la mezcla hasta los 5°C. Se añade la mezcla PCR (10 mM de Tris/HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl) que contiene 2,5 U de ADN polimerasa *Taq* (Perkin Elmer Cetus), 2 mM de $MgCl_2$ y 0,75 µM de cebador sentido o directo (10F, más abajo) hasta un volumen final de 100 µl. Se recubren los tubos con 100 µl de aceite mineral y se lleva a cabo la amplificación por PCR en 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos, finalizando con 72°C durante 10 minutos. Se añaden 20µl de producto PCR amplificado a geles de agarosa al 2%/TAE (Tris-acetato-EDTA [ácido etilendiaminotetracético) que contengan 0,5 µg/ml de bromuro de etidio a lo largo de una escalera de ADN adecuada y se realiza la detección mediante un transiluminador UV.

La reacción positiva será indicada por un producto de 135 pb. La sensibilidad del ensayo es de aproximadamente 0,01 pg de ARN purificado de YHV (≈ 10^3 genomas).

Secuencias de cebadores PCR:

10F: 5'-CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3'
144R: 5'-AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT-3'

Protocolo 2: PCR anidada RT para la detección diferenciada del YHV y el GAV en gambas sanas o enfermas.

Para la síntesis de cADN, se mezclan 2 µl de ARN (lo ideal es 1.0 µg de ARN total, si se cuantifica) y 0,7 µl de 50 pmoles/µl cebadores GY5 hasta un total de 6 µl en agua tratada con DEPC, se incuba a 70°C durante 10 minutos y se enfría en hielo. Se añade 2 µl de tampón Superscript II × 5 (250 mM de Tris/HCl, pH 8,3, 375 mM de KCl, 15 mM de $MgCl_2$), 1 µl 100 mM de DTT y 0,5 µl 10 mM de mezcla stock de dNTP (i.e. 10 mM de dATP, 10 mM de dTTP, 10 mM de dCTP, 10 mM de dGTP) y se mezcla suavemente. Se precalienta a 42°C durante 2 minutos, se añade 0,5 µl de 200 U/µl de transcriptasa inversa de Superscript II (Gibco-BRL) y se incuba a 42°C durante 1 hora. Luego se calienta la reacción a 70°C durante 10 minutos, se enfría en hielo y se

centrifuga brevemente en un microcentrífuga para recoger el contenido del tubo. Para el primer paso de la PCR, se prepara una mezcla de reacción de 50 µl que contenga 1 × tampón *Taq* (10 mM de Tris/HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 0,1% de Tritón X-100), 1,5 mM de $MgCl_2$, 35 pmoles de cada uno de los dos cebadores GY1 y GY4, 200 µM de cada uno de los cebadores dATP, dTTP, dCTP y dGTP y 2,5 U de polymerasa *Taq* (Promega) en un tubo cuya pared sea de 0,5 ml. Se recubre la mezcla de reacción con 50 µl de parafina líquida, se calienta a 85°C durante 2–3 minutos y luego se añade 1 µl de cADN. Se realiza la amplificación por PCR utilizando 35 ciclos 95°C durante 30 segundos, 66°C durante 30 segundos, y 72°C durante 45 segundos, con una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Para el segundo paso de la PCR, se prepara una mezcla de reacción de 50 µl que contenga 2 µl de producto del primer paso de la PCR, 1 × tampón *Taq* (ver más arriba), 1,5 mM de $MgCl_2$, 35 pmoles de cada cebador GY2, Y3 y G6, 200 µM de cada uno de los cebadores dATP, dTTP, dCTP y dGTP y 2,5 U de polimerasa *Taq* (Promega) en un tubo con pared de 0,5 ml y recubierto con parafina líquida. Se realiza la PCR en las mismas condiciones de amplificación descritas anteriormente. Se añade 10 µl del producto PCR amplificado a geles de agarosa al 2%/TAE que contengan 0,5 µg/ml de bromuro etidio a lo largo de una escalera de ADN adecuada y se realiza la detección mediante un transiluminador UV.

Si la carga vírica es lo suficientemente grande, se amplificará ADN de 794 pb bien sea de GAV o de YHV en el primer paso de la PCR. En el segundo paso de la PCR, un producto de 277 pb indica que se ha detectado el YHV y un producto de 406 pb indica que se ha detectado el GAV. La presencia de ambos productos, 406 pb y 277 pb, indica la existencia de una infección doble por GAV y YHV. La sensibilidad de detección del segundo paso de la PCR es ~1.000 veces mayor que la del primer paso de la PCR, y el ARN de GAV o de YHV puede detectarse hasta un límite de 10 fg de ARN total de órgano linfoide.

Las secuencias de cebadores para RT-PCR genérica para el GAV y el YHV (GY) o específica para el GAV (G) o el YHV (Y) son las siguientes:

GY1: 5'-GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG-3'
GY2: 5'-CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3'
GY4: 5'-GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG-3'
GY5: 5'-GAG-CTG-GAA-TTC-AGT-GAG-AGA-ACA-3'
Y3: 5'-ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT-3'
G6: 5'-GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT-3'

Protocolo 3: PCR anidada RT para la detección de todos los genotipos actualmente conocidos del complejo de la cabeza amarilla (incluidos el YHV y el GAV).

Para la síntesis de cADN, se mezcla 2 µl de ARN (lo ideal es 1,0 µg de ARN total, si se cuantifica), 50 ng de hexámeros aleatorios como cebadores y 1,0 µl 10 mM de dNTP hasta completar un volumen total de 14 µl en agua tratada con DEPC estéril, se incuba a 65°C durante 5 minutos y se enfría en hielo. Se añade 4,0 µl de tampón Superscript III × 5 (Invitrogen), 1,0 µl 100 mM de DTT, 1,0 µl 40 U/µl de RNasaOUT™ (Invitrogen) y 1,0 µl 200 U/µl de transcriptasa inversa Superscript (Invitrogen) y se mezcla con suavidad. Se incuba a 25°C durante 5 minutos y luego a 42°C durante 55 minutos, se detiene la reacción calentando a 70°C durante 15 minutos, se enfría en hielo y se centrifuga brevemente en un microcentrífuga para recoger el contenido del tubo. Para el primer paso de la PCR, se añade 1 µl de cADN a una mezcla de reacción total de 25 µl que contenga 1 × tampón *Taq* (10 mM de Tris/HCl, pH 9,0, 50 mM de KCl, 0,1% de Tritón X-100), 1,5 µl 25 mM de $MgCl_2$, 0,35 µl de mezcla de cebadores que contenga 25 pmoles/µl de cada grupo de cebadores (véase más adelante) YC-F1ab y YC-R1ab, 0,5 µl 10 mM de mezcla de dNTP y 0,25 µl 5 U/µl de ADN polimerasa *Taq* (*Fisher Biotech*). Se realiza la amplificación por PCR mediante desnaturalización a 95°C durante

1 minuto seguida de 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 40 segundos, y una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Para el segundo paso de la PCR, se usa 1 µl del primer producto PCR en la mezcla de reacción tal como se preparó anteriormente, pero sustituyendo por los grupos de cebadores YC-F2ab y YC-R2ab. Se realiza la amplificación por la PCR mediante desnaturalización a 95°C durante 1 minuto seguida de 35 ciclos a 95ºC durante 30 segundos, 60ºC durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos, con una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Se añade 8 µl de producto PCR amplificado a geles de agarosa al 2%/TAE que contengan 0,5 µg/ml de bromuro de etidio a lo largo de una escalera de ADN adecuada y se realiza la detección mediante un transiluminador UV.

Si la carga vírica es lo bastante alta, se amplificará ADN de 358 pb en el primer paso de la PCR. En el segundo paso de la PCR (anidada) se amplifica un producto de 146 pb. La detección de estos productos indica que se ha detectado uno de los seis genotipos del complejo de la cabeza amarilla. Es posible la tipificación adicional del genotipo (en caso de que así se requiera) mediante análisis de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los dos productos PCR seguido de la comparación de secuencias de los genotipos por alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético. Los límites de la sensibilidad de detección del primer paso de la PCR y la PCR anidada son 2.500 y 2,5 moldes de RNA, respectivamente.

Secuencias de cebadores de la PCR (cada cebador comprende un conjunto de cantidades iguales de dos secuencias relacionadas de oligonucleótidos):

Conjunto YC-F1ab:	5'-ATC-GTC-GTC-AGC-TAC-CGC-AAT-ACT-GC-3' 5'-ATC-GTC-GTC-AGY-TAY-CGT-AAC-ACC-GC-3'
Conjunto YC-R1ab:	5'-TCT-TCR-CGT-GTG-AAC-ACY-TTC-TTR-GC-3' 5'-TCT-GCG-TGG-GTG-AAC-ACC-TTC-TTG-GC-3'
Conjunto YC-F2ab:	5'-CGC-TTC-CAA-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA-3' 5'-CGC-TTY-CAR-TGT-ATC-TGC-ATG-CAC-CA-3'
Conjunto YC-R2ab:	5'-RTC-DGT-GTA-CAT-GTT-TGA-GAG-TTT-GTT-3' 5'-GTC-AGT-GTA-CAT-ATT-GGA-GAG-TTT-RTT-3'
Códigos de bases mixtas:	R(AG), Y(CT), M(AC), K(GT), S(GC), W(AT), H(ACT), B(GCT), V(AGC), D(AGT), N(AGCT).

Hibridación in situ

A continuación describimos el protocolo de Tang & Lightner (26). El método es adecuado para la detección del YHV o el GAV (27). A fin de conservar el ARN vírico, se fijan gambas vivas con fijador de Davidson modificado, neutralizado con tampón, y sin ácido acético (fijador RF) (9). Se procesan las gambas fijadas mediante métodos histológicos estandarizados, y se realizan cortes de 4 µm de espesor sobre portaobjetos Superfrost Plus (Fisher Scientific, Pennsylvania, USA). Antes de la hibridación, se incuban los cortes a 65°C durante 45 minutos, se retira la parafina con Hemo de (Fisher Scientific, Pennsylvania, USA), y se rehidrata con una serie de etanoles y agua. Se digieren los cortes en proteinasa K (100 µg/ml, en 50 mM de Tris/HCl, pH 7,4, 10 mM de NaCl, 1 mM de EDTA) durante 15 minutos a 37°C, y se fija en formaldehído (0,4%) durante 5 minutos. Se lava en 2 × SSC (citrato salino estándar), a continuación se prehibrida con 500 µl de solución de prehibridación (4 × SSC, 50% formamida, 1 × solución Denhardt, 0,25 mg/ml de ARN de levadura, 0,5 mg/ml de ADN de esperma de salmón triturado, sulfato de dextrano al 5%) a 42°C durante 30 minutos. Para la hibridación, se cubren los cortes con 250 µl de solución de hibridación que contenga una sonda marcada con digoxigenina (20–40 ng/ml) a 42°C durante toda la noche. Al día siguiente, se lavan los cortes del siguiente modo: 2 × SSC una vez durante 30 minutos a temperatura ambiente; 1 × SSC dos veces durante 5 minutos a 37°C; 0,5 × SSC dos veces durante 5 minutos a 37°C. Se incuban los cortes con un conjugado de

anti-digoxigeninna de oveja-fosfatasa alcalina (Roche) a 37°C durante 30 minutos. Se lava dos veces con 0,1 M de Tris/HCl, pH 7,5, 0,15 M de NaCl durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se lava con 0,1 M de Tris/HCl, pH 9,5, 0,1 M de NaCl. Se incuba con nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en la oscuridad durante 1–2 horas para que se desarrolle el color. Se tiñe para contraste con marrón Bismarck Y (0,5%), se deshidrata con una serie de etanol y Hemo de, se añade Permount (Fisher Scientific, Pennsylvania, USA) y se cubre con un cubreobjetos. Las células infectados por YHV presentan un color entre azul y morado sobre un fondo marrón de contratinción. Se deben incluir controles positivos de tejido infectado por YHV y controles negativos de tejido de gambas sanas. Se puede preparar la sonda de diagnóstico mediante etiquetado por PCR usando los siguientes cebadores:

YHV1051F: 5'-ACA-TCT-GTC-CAG-AAG-GCG-TC-3'
YHV1051R: 5'-GGG-GGT-GTA-GAG-GGA-GAG-AG-3'

4. VALORACIÓN DE LAS PRUEBAS SEGÚN SU FINALIDAD

En el cuadro 1 aparecen los métodos disponibles en la actualidad para la vigilancia, detección y diagnóstico del YHV. Los símbolos utilizados en el cuadro indican: A = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad, especificidad y sensibilidad del diagnóstico; B = se trata de un método estándar con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; C = aplicable en algunas situaciones, pero su coste, precisión y otros factores limitan seriamente su aplicabilidad; D = actualmente no se recomienda el método para este fin. Esta clasificación es un tanto subjetiva ya que en el tema de la adecuación están implicadas otras cuestiones, como la fiabilidad, la sensibilidad, la especificidad y la utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías A o B se han sometido a estandarización y validación formales (véase el capítulo 1.1.2), su carácter rutinario y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las convierte en aceptables.

Cuadro 1. *Métodos de vigilancia, detección y diagnóstico de YHV*

Método	Vigilancia				Presuntivo	Confirmativo
	Larvas	PLs	Juveniles	Adultos		
Síntomas generales	D	D	C	C	C	D
Histopatología	D	D	C	C	A	B
MET	D	D	C	C	D	A
Bioensayo	D	D	D	D	C	B
Pruebas basadas en anticuerpos	D	D	C	C	A	B
PCR	A	A	A	A	A	A
Sondas de ADN *in situ*	D	D	C	C	A	A
Secuencia	D	D	D	D	D	A

PLs = postlarvas; MCC = microscopía de campo claro; MET = microscopía electrónica de transmisión; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

5. CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO CONFIRMATIVO

a) Definición de caso sospechoso

La enfermedad de la cabeza amarilla es sobre todo una enfermedad del *Penaeus monodon* de cultivo causada por el virus de la enfermedad de la cabeza amarilla. La enfermedad afecta normalmente a formas juveniles tempranas y tardías y puede presentarse en forma de cese de la alimentación, concentración de gambas en los bordes del estanque. Las gambas moribundas pueden presentar un aspecto blanquecino y una decoloración amarillenta del cefalotórax causada por el hepatopáncreas amarillo subyacente. La mortalidad puede alcanzar el 100%, pero también se dan

infecciones subclínicas. Los criterios de diagnóstico confirmativo se presentan resumidos en la sección 3 del presente capítulo.

b) Definición de caso confirmado

La enfermedad de la cabeza amarilla puede confirmarse mediante la detección de niveles elevados de infección propagada por los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico por medio de la hibridación *in situ* conjuntamente con la detección de productos amplificados del tamaño prescrito utilizando ensayos RT-PCR discriminatorios como los descritos en la sección 3 del presente capítulo. Puesto que en algunas regiones son comunes las infecciones crónicas de bajo nivel debidas al virus del complejo de la fiebre amarilla, la detección de la presencia del virus no constituye por sí sola una prueba de etiología.

6. MÉTODOS DE DIAGNÒSTICO/DETECCIÓN PARA DECLARAR LA AUSENCIA DE INFECCIÓN

La PCR de dos pasos y la secuenciación, son los métodos prescritos para declarar la ausencia de infección. Se requieren resultados negativos de la PCR de dos pasos. Cuando un resultado positivo por PCR de dos pasos no puede confirmarse mediante secuenciación, eso también cuenta como resultado negativo.

REFERENCIAS

1. ALBALADEJO J.D., TAPAY L.M., MIGO V.P., ALFAFARA C.G., SOMGA J.R., MAYO S.L., MIRANDA R.C., NATIVIDAD K., MAGBANUA F.O., ITAMI T., MATSUMURA M., NADALA E.C.B. JR & LOH P.C. (1998). Screening for shrimp viruses in the Philippines. *In:* Advances in Shrimp Biotechnology, Flegel T.W., ed. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, 251–253.

2. BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 114 pp.

3. CHANTANACHOOKIN C., BOONYARATPALIN S., KASORNCHANDRA J., DIREKBUSARAKOM S., AEKPANITHANPONG U., SUPAMATTAYA K., SRIURAITANA S. & FLEGEL T.W. (1993). Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.,* **17**, 145–157.

4. COWLEY J.A., CADOGAN L.C., WONGTEERASUPAYA C., HODGSON R.A.J., SPANN K.M., BOONSAENG V. & WALKER P.J. (2004). Differential detection of gill-associated virus (GAV) from Australia and yellow head virus (YHV) from Thailand by multiplex RT-nested PCR. *J. Virol. Methods,* **117**, 49–59.

5. COWLEY J.A., HALL M.R., CADOGAN L.C., SPANN K.M. & WALKER P.J. (2002). Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.,* **50,** 95-104.

6. FLEGEL T.W., BOONYARATPALIN S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1997). Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. *In:* Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 285–296.

7. FLEGEL T.W., FEGAN D.F. & SRIURAIRATANA S. (1995). Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand. *In:* Diseases in Asian Aquaculture II, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 65–79.

8. FLEGEL T.W., SRIURAIRATANA S., WONGTERRASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1995). Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. *In:* Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 76–83.

9. HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

10 KHONGPRADIT, R., KASORNCHANDRA, J., AND BOONYARATALIN, S. (1995). Susceptibility of the postlarval stages of black tiger shrimp (Penaeus monodon) to yellow-head baculovirus (YBV). *In:* Diseases in Asian Aquaculture II, Shariff, M., Subasinghe, R.P., and Arthur, J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manilla, 6.

11. LIGHTNER D.V. (ED.) (1996). Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.

12. LIGHTNER D.V., HASSON, K.W., WHITE, B.L. & REDMAN R.M. (1998). Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health,* **10**, 271–281.

13. LIMSUWAN C. (1991). Handbook for Cultivation of Black Tiger Prawns. Tansetakit, Bangkok, Thailand (in Thai).

14. LOH P.C., CESAR E., NADALA B. JR, TAPAY L.M. & LU Y. (1998). Recent developments in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. *In:* Advances in Shrimp Biotechnology, Flegel T.W., ed. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, 255–259.

15. LONGYANT, S., SITHIGORNGUL, P., CHAIVISUTHANGKURA, P., RUKPRATANPORN, S., SITHIGORNGUL, W. & MENASVETA, P. (2005). Differences in the susceptibility of palaemonid shrimp species to hellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **64,** 5-12.

16. LU Y., TAPAY L.M., BROCK J.A. & LOH P.C. (1994). Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone) *J. Fish Dis*., **17**, 649–656.

17. LU Y., TAPAY L.M., GOSE R.B., BROCK J.A. & LOH P.C. (1997). Infectivity of yellow head virus (YHV) and the Chinese baculo-like virus (CBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *In:* Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 297–304.

18. MOHAN C.V., SHANKAR K.M., KULKARNI S. & SUDHA P.M. (1998). Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Dis. Aquat. Org.,* **34**, 9–12.

19. NASH G.L., AKARAJAMORN A. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1995). Histology and rapid haemocytic diagnosis of yellow-head disease in *Penaeus monodon. In:* Diseases in Asian Aquaculture II, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 89–98.

20. NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER, D.V. (1998). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture,* **160**, 19–30.

21. PANTOJA C.R. & LIGHTNER D.V. (2001). Necrosis due to WSSV can mimic YHV lesions in lymphoid organ of penaeid shrimp. *The Advocate,* **4** (3), 15.

22. SPANN K.M., COWLEY J.A., WALKER P.J. & LESTER R.J.G. (1998). A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.,* **31**, 169–179.

23. SPANN K.M., DONALDSON R.A., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2000). Differences in susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Org.,* **42**, 221–225.

24. SPANN, K.M., MCCULLOCH, R.J., COWLEY, J.A. & WALKER, P.J. (2003). Detection of gill-associated virus (GAV) by *in situ* hybridisation during acute and chronic infections in *Penaeus monodon* and *Penaeus esculentus* shrimp. *Dis. Aquat. Org.,* **56,** 1-10.

25. SPANN K.M., VICKERS J.E. & LESTER R.J.G. (1995). Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon* from Australia. *Dis. Aquat. Org.,* **23**, 127–134.

26. TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (1999). A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.,* **35**, 165–173.

27. TANG K.F.J., SPANN K.M., OWENS L. & LIGHTNER D.V. (2002). *In situ* detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe. *Aquaculture*, **205**, 1–5.

28. WALKER, P.J., BONAMI, J.R., BOONSAENG, V., CHANG, P.S., COWLEY, J.A., ENJUANES, L., FLEGEL, T.W., LIGHTNER, D.V., LOH, P.C., SNIJDER, E.J. & TANG, K. (2004). *Roniviridae.* In: *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV, Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball L.A., eds. Elsevier/Academic Press, London, 973-977.

29. WALKER P.J., COWLEY J.A., SPANN K.M., HODGSON R.A.J., HALL, M.R & WITHYACHUMNARNKUL, B. (2001). Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. *In:* The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 292–302.

30. WANG Y.-C. & CHANG P.-S. (2000). Yellow head virus infection in the giant tiger prawn *Penaeus monodon* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.,* **35,** 1–10.

31. WANG C.S., TANG K.F.J. & CHEN S.N. (1996). Yellow head disease-like infection in the Kuruma shrimp Penaeus japonicus cultured in taiwan. *Fish Path.*, **31,** 177–182.

32. WIJEGOONAWARDANE, P., COWLEY, JA, KIATPATHOMCHAI, W, MIELSEN, L & WALKER, PJ. (2004). Phylogenetic analysis and evidence of genetic recombination among six genotypes of yellow head complex viruses from *Penauen monodon*. Book of Abstracts. 7th Asian Fisheries Forum, Penang, Malaysia, 30 November-4 December 2004. p 210.

33. WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1997). Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.,* **31**, 181–186.

*
* *

NB: Existe un laboratorio de referencia de la OIE para la enfermedad de la cabeza amarilla (véase el cuadro al final del presente *Manual de animales acuáticos* o consúltese la lista actualizada en la página Web de la OIE : www.oie.int).